

A. MONZINI U. BOGNETTI

Sulla stabilizzazione della caseina con pectina

A. MONZINI U. BOGNETTI

Sulla stabilizzazione della caseina con pectina

Sulla stabilizzazione della caseina con pectina

di ANDREA MONZINI

e di UMBERTO BOGNETTI

Stazione Sperimentale del Freddo di Milano

Nella realizzazione di un programma di ricerche tecnologiche su una nuova utilizzazione del latte in miscela con polpe naturali di frutta, dovemmo affrontare il problema della stabilizzazione del latte stesso a pH inferiori a quello caratteristico del punto isoelettrico della caseina. Come è noto, la caseina ha punto isoelettrico a pH 4,5, soglia molto più elevata di quella che si raggiunge dopo l'aggiunta di succhi o polpe di frutta (talora si giunge a pH 3,0).

I nostri primi tentativi furono per così dire classici, vale a dire vennero impiegate miscele di sali organici (citrati, lattati, malati) ed inorganici (fosfati), quali sistemi tampone. Metodo già impiegato con successo nell'industria del latte alimentare per correggere, entro limiti modesti, l'eccessiva acidità del latte, causa di instabilità della caseina e di altri inconvenienti.

I risultati conseguiti, a causa delle alte concentrazioni di sali necessarie, con conseguente modificazione dei caratteri organolettici, non furono di nostra soddisfazione.

Cercammo perciò di battere altre vie e provammo ad impiegare additivi di natura colloidale, nella speranza che essi potessero avere efficacia protettiva sulla molecola della caseina.

Vennero perciò sperimentati e provati colloidali di origine proteica (gelatina, alginati) e di origine carboidratica (pectine e carbossimetilcellulosa). I risultati ottenuti con colloidali di natura carboidratica furono incoraggianti e portarono a notevoli risultati di stabilizzazione, mentre invece quelli ottenuti con colloidali di natura proteica risultarono inefficaci.

In questa comunicazione intendiamo riferire sulla capacità manifestata da alcuni tipi di pectina nell'impedire la coagulazione della caseina al suo naturale punto isoelettrico. In particolare esporremo le ricerche da noi condotte allo scopo di conoscere la ragione per cui avviene detta stabilizzazione.

PARTE SPERIMENTALE

1. Capacità stabilizzante della pectina

Le prove vennero condotte con pectine di mele a diverso grado di metossilazione e con pectina grezza di limone. Le loro caratteristiche erano le seguenti:

Pectina di mela tipo A	solubilità in H ₂ O gruppi metossilici (*)	86,3% 7,5%
Pectina di mela tipo B	solubilità in H ₂ O gruppi metossilici (*)	82,4% 4,5%
Pectina di mela tipo C	solubilità in H ₂ O gruppi metossilici (*)	88,0% 4,1%
Pectina grezza di limone tipo D	solubilità in H ₂ O gruppi metossilici (*)	98,5% 6,8%

(*) I gruppi metossilici vennero determinati secondo C. L. Hilton - Fruit Pectins. Their Chemical Behaviour - Chem. Pret. Co., New York, 1942.

Nel diagramma 1 sono riportate le curve lungo le quali è posto il punto isoelettrico delle miscele per concentrazioni variabili di pectina e di acido citrico 0,1N. In tal modo viene posta in risalto la correlazione interessante tra stabilizzazione, concentrazione in pectina ed in acido citrico nelle miscele.

L'esame delle curve consente di constatare come il comportamento della caseina sia differente a seconda delle pectine addizionate. La coagulazione viene impedita solo dall'aggiunta di pectine ad alto numero di metossili, quale il tipo A ed il tipo D. Le pectine a medio e basso numero di metossili (tipi B e C) risultano incapaci di stabilizzare la caseina, anzi ne rendono ancor più critica la stabilità stessa.

Convinti che ci trovassimo di fronte ad un fenomeno chimico-fisico di interazione tra additivo e proteina, cercammo di conoscere l'optimum di temperatura della stabilizzazione.

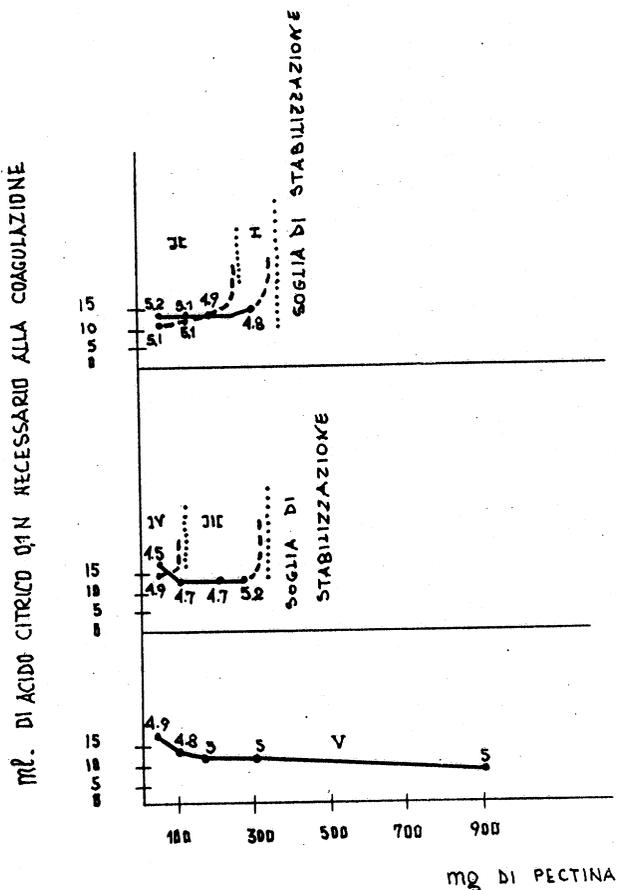
A tal fine cercammo la linea sulla quale passavano i punti limite di minima concentrazione della pectina necessaria alla stabilizzazione e la linea del punto limite di massima concentrazione alla quale la stabilizzazione non si verificava.

Lo stato di coagulazione e non coagulazione venne ricercato mantenendo costante l'aggiunta di acido citrico (ml 30 di soluzione 0,1N). Le prove vennero condotte su quantità costanti di latte magro (ml 25) addizionato di quantità variabili di pectina tipo A. L'aggiunta della soluzione di acido citrico venne effettuata in tempi costanti dopo 30' dalla miscelazione della pectina al latte, alle diverse temperature controllate.

Le numerose prove condotte, più volte ripetute, hanno consentito di costruire un diagramma (diagramma 2)

DIAGRAMMA 1

Curva di stabilizzazione della caseina in presenza di pectina. I. pectina tipo A; II. pectina tipo A (p. 1) + saccarosio (p. 10); III. pectina tipo D; IV. pectina tipo D (p. 1) + saccarosio (p. 10); V. pectina tipo B e tipo C. I numeri rappresentano i pH delle miscele.



che esprime la correlazione esistente tra capacità stabilizzante della pectina e temperatura di stabilizzazione.

Risulta in tal modo che a 25° C si ottiene la stabilizzazione con la minima quantità di pectina addizionata, in altri termini a 25° C la capacità stabilizzante della pectina sarebbe la più alta.

È interessante osservare che, a temperature inferiori, la capacità stabilizzante diminuisce, come se essa fosse caratterizzata da una reazione di natura chimica. D'altra parte tale reattività risulterebbe diminuita anche a temperature superiori ai 25° C. In questo caso potrebbe giocare, in contrasto con la capacità stabilizzante, la più sensibile tendenza allo stato di aggregazione che, in ambiente acido, caratterizza le proteine e che ad un certo livello di temperatura porta alla soglia di coagulazione termica.

2. Ricerche sulle origini della stabilizzazione della caseina

Il fatto che, per addizione di pectina ad alto numero di metossili, il punto isoelettrico della caseina si sposti a pH inferiori, lascia supporre che l'azione protettrice del colloide addizionato sia in qualche modo legata ad

una interazione, implicante qualche tipo di legame chimico, tra colloide protettore e colloide protetto.

Instaurammo perciò una serie di analisi chimiche e fisiche al fine di poter riscontrare quali erano le effettive differenze tra il coagulo ottenuto per acidificazione della caseina ed il coagulo ottenibile per acidificazione di miscele latte-pectina ad alto numero di metossili.

I due coaguli che abbiamo preso in esame vennero ottenuti in identiche condizioni sperimentali (schema allegato). Il primo per diretta precipitazione della caseina da latte completamente scremato (prodotto A) ed il secondo dallo stesso latte per precipitazione ottenuta dopo 30' dall'addizione di pectina tipo A (prodotto B). I coaguli così ottenuti vennero sottoposti a ripetuti lavaggi con acqua distillata ed a centrifugazione. Quindi essi vennero liofilizzati e mantenuti, fino al momento dell'analisi, in essiccatore sotto vuoto. Non abbiamo ritenuto opportuno utilizzare sistemi di purificazione più efficaci (soluzioni debolmente alcaline, solventi organici) onde evitare qualsiasi causa di denaturazione dei prodotti così ottenuti.

A) Analisi chimica

I prodotti A e B vennero sottoposti ad analisi riguardo il loro contenuto in azoto (micro-Kjeldhal), in calcio (metodo ⁽¹⁾ al Versene), in fosforo (metodo ⁽²⁾ al fosfomolibdato stricnico). Inoltre sono state quantitativamente ricercate le pectine solubili in NaOH ed in H₂O, limitatamente al prodotto B, secondo il metodo al carbazolo ⁽³⁾.

Dal complesso dei risultati ottenuti e riportati dalla tabella risulta che:

a) il prodotto B, proveniente dalla precipitazione della miscela pectina + latte magro, a differenza del prodotto A, precipitato ottenuto da solo latte magro, con-

DIAGRAMMA 2

Capacità stabilizzante della pectina in rapporto alla temperatura di addizione. a = linea limite di stabilizzazione; b = linea limite di coagulazione. I numeri rappresentano i pH delle miscele.

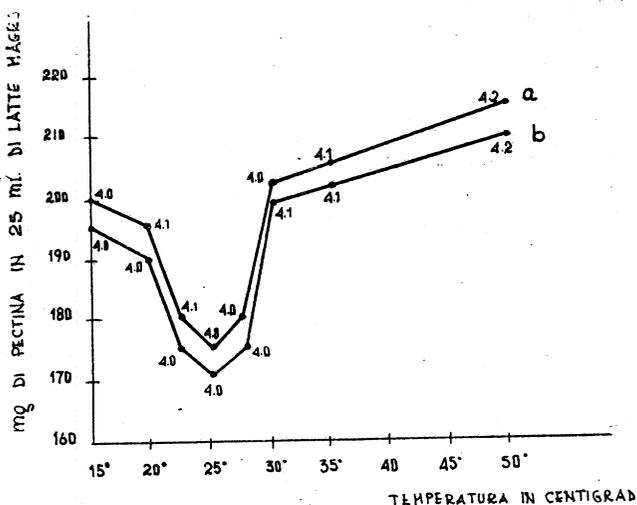
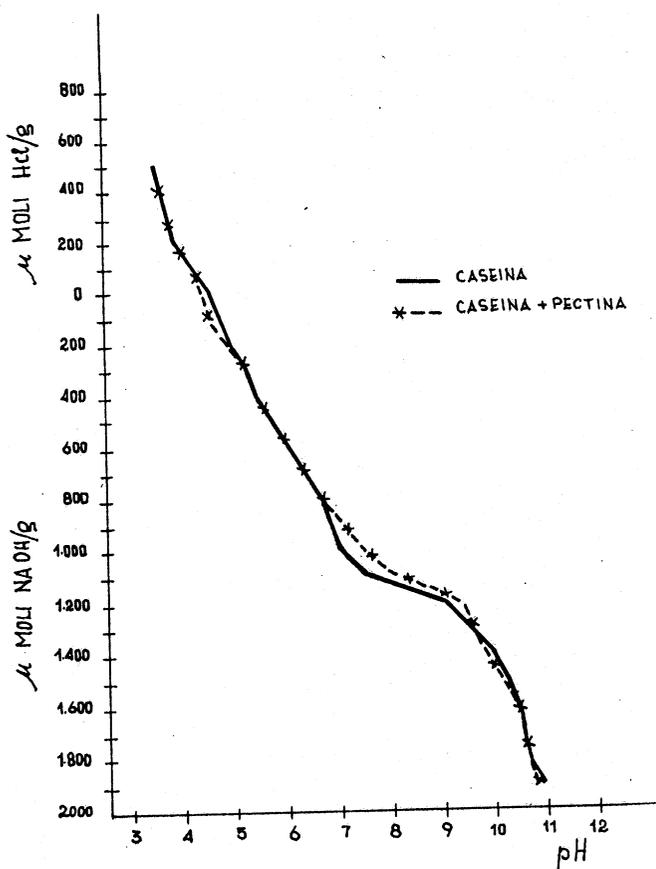


DIAGRAMMA 3

Titolazione acido-basica del prodotto A (caseina) e del prodotto B (caseina + pectina).



tiene piccole quantità di calcio. Questo fa supporre che parte del calcio sia salificato con la pectina a sua volta insolubilizzatasi perché combinata con la caseina.

b) il prodotto B ha un minor contenuto in azoto ed in fosforo. Questo può essere spiegato dal fatto che alla caseina è legata della pectina. È quindi naturale che, all'analisi chimica, azoto e fosforo risultino ponderalmente in minor percentuale.

c) la maggior parte della pectina legata alla caseina non risulta più solubile in acqua, bensì solo solubile in debole soluzione di soda. Questo fatto, a nostro giudizio, ha grande rilievo poiché direttamente dimostra l'intervento di una reazione chimica tra caseina e pectina. La ristabilita solubilità, dopo addizione di alcali diluiti (Na OH N/20), è verosimilmente dovuta ad idrolisi alcalina dei legami formati.

d) circa il 10% della pectina, addizionata al latte magro, risulta combinata con la caseina.

e) nelle condizioni di concentrazione sperimentale, circa il 30% della caseina permane in soluzione nel siero dopo coagulazione della cagliata.

B) Titolazione acido-basica

Sia il prodotto A che il prodotto B vennero sottoposti alla titolazione acido-basica secondo la tecnica de-

scritta da N.Y. Hipp e al. (4) mantenendo costante la forza ionica ($\mu_i = 0,05$). I valori di pH trovati hanno consentito di costruire delle curve (diagramma 3) che manifestano una certa differenza di comportamento tra i prodotti A e B.

Tra i pH 4,2 e pH 5,0 si rileva una maggiore capacità di combinazione con gli alcali per B, invece tra pH 6,5 e pH 9,2 la situazione si inverte in quanto la caseina sola (A) rivela una maggior capacità di combinazione con gli alcali. A pH 9,2 si forma un chiasma tra le curve, poiché B (caseina + pectina) riacquista una maggior capacità di combinazione con le basi.

C) Esame elettroforetico

La possibilità, scaturita dalla titolazione acido-basica, che il prodotto B avesse cariche ben differenziate dal prodotto A, venne controllata con l'impiego della elettroforesi su carta e su agar.

L'elettroforesi su carta venne condotta seguendo la seguente tecnica: soluzioni al 4% dei prodotti A e B dializzati, f.e.m. = 150 V, tampone = fosfato-veronal (pH 8,6, 0,05), carta Sheleicher e Schuell n. 2043.

Qui sotto vengono riportati i valori di velocità elettroforetica derivanti da una media di numerose prove. Sia per A che B è sempre stata riscontrata la presenza di due bande, raramente è apparsa una debole terza banda.

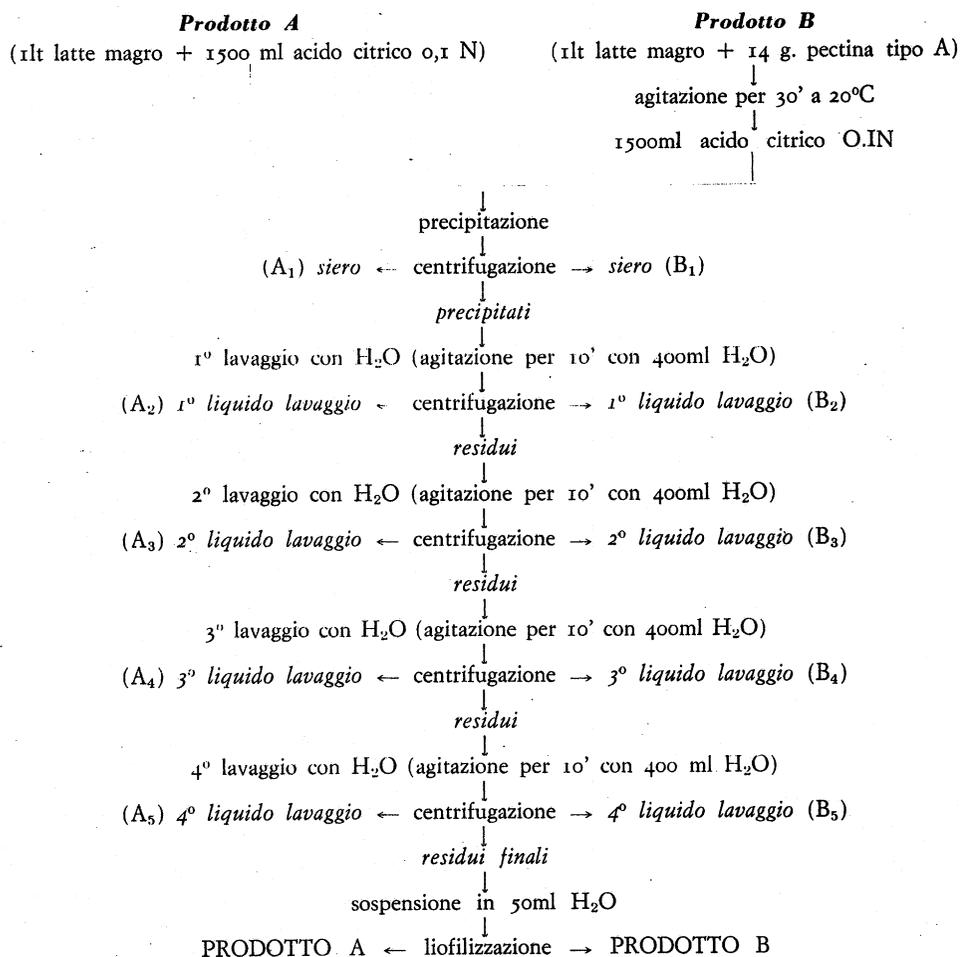
	U 10 ⁵ cm. ² V/sec.		Ripartizione % del totale
	banda		
Prodotto A .	banda	-2,1	66
	»	-1,0	34
Prodotto B .	»	-2,0	64
	»	-0,9	36

La ripartizione tra le bande ha solo carattere indicativo. È invece interessante osservare la differenza di mobilità che si è manifestata in tutte le prove.

L'elettroforesi su agar ci ha consentito di ottenere elettroforetogrammi con buona risolvibilità a diverse concentrazioni idrogenioniche. La tecnica impiegata è la seguente: soluzione tampone di fosfati $\mu_i = 0,06$, pH variabili tra 6,2 e 7,7, f.e.m. = 260 V, tempo di risoluzione variabile tra 4 e 5 h.

Nel diagramma 4 riproduciamo gli elettroforetogrammi più rappresentativi per tutti i pH di prova. Da essi risulta che il prodotto A (caseina sola) rivela una maggior selettività nelle sue cariche elettriche (3 bande) tra i pH 6,5 e 7,0, mentre invece il prodotto B (caseina + pectina) appare caratterizzato da cariche poste su due soli livelli (2 bande). Questi referti, ancor meglio di quelli fornitici dall'elettroforesi su carta, indirettamente dimostrano che la pectina si è combinata con la caseina, in modo tale da livellare quelle cariche che normalmente si rivelano tra pH 6,6 e pH 7,0.

È anche da notare che detto fenomeno coincide con le già rivelate differenze alla titolazione acido-basica tra i due prodotti. È proprio a livello di queste concentrazio-



Schema della metodologia seguita nella preparazione della caseina sola (prodotto A) e della caseina + pectina (prodotto B).

ANALISI CHIMICA DEI PRODOTTI A e B

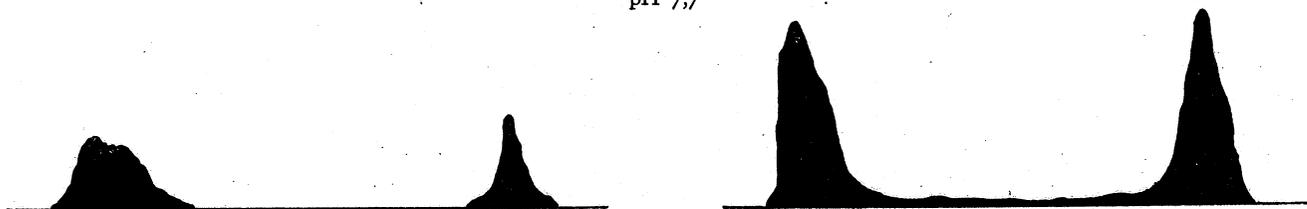
(Valori medi di tre analisi)

Sigla nello schema		Ca %	P %	N %	Sigla nello schema		Ca %	P %	N %	pectine sol. in H ₂ O	pectine sol. in NaOH
Contenuti percentuali	A	tracce	0,790	15,10	B	0,038	0,671	14,20	tracce	8,53	
	A ₁	0,059	0,022	0,05	B ₁	0,052	0,024	0,12	nd	nd	
	A ₂	0,028	0,005	0,013	B ₂	0,023	0,008	0,16	nd	nd	
	A ₃	0,011	0,001	0,003	B ₃	0,009	0,001	0,01	nd	nd	
	A ₄	0,006	0,001	0,003	B ₄	0,004	0,001	0,01	nd	nd	
	A ₅	tracce	0,001	0,003	B ₅	0,002	0,001	0,01	nd	nd	
Ripart. percent. sul totale	A	—	0,20	3,92	B	0,01	0,12	2,55	—	1,53	
	A ₁	1,06	0,44	1,11	B ₁	0,02	0,48	2,40	nd	nd	
	A _{2, 3, 4, 5}	0,19	0,08	0,24	B _{2, 3, 4, 5}	0,14	0,13	0,28	nd	nd	
Totale		1,25	0,72	5,27	Totale		1,17	0,73	5,23	—	—

DIAGRAMMA 4

Ripartizione elettroforetica su agar del prodotto A (caseina) e del prodotto B (caseina + pectina).

pH 7,7



PRODOTTO B

Volts 260-260

t = 4h 51'

mA = 43-52

PRODOTTO A

μ i = 0,06 Tampone fosfatico

pH 7,0



PRODOTTO B

Volts 260-255

t = 4h 27'

mA = 41-48

PRODOTTO A

μ i = 0,06 Tampone fosfatico

PH 6,8



PRODOTTO B

Volts 260-255

t = 5h

mA = 38-42

PRODOTTO A

μ i = 0,06 Tampone fosfatico

pH 6,5



PRODOTTO B

Volts 260-255

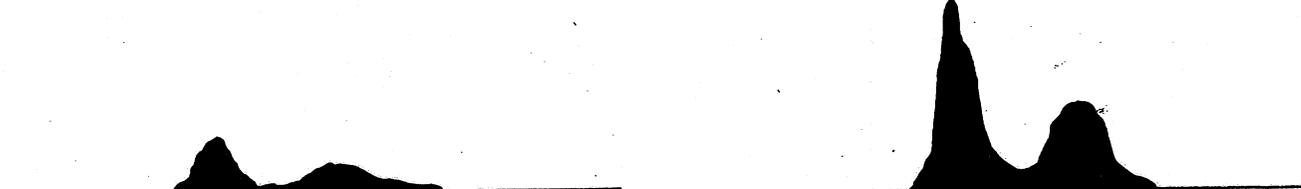
t = 5h

mA = 38-42

PRODOTTO A

μ i = 0,06 Tampone fosfatico

pH 6,2



PRODOTTO B

Volts 260-250

t = 5h 3'

mA = 25-32

PRODOTTO A

μ i = 0,06 Tampone fosfatico

ni idrogeniche che si manifesta la più sensibile differenza nella loro capacità di combinazione con gli alcali.

D) *Analisi allo spettro infrarosso*

Su entrambi i prodotti vennero condotte osservazioni nello spettro infrarosso utilizzando come disperdente KBr (diagramma 5). Si rivelano in complesso marcate differenze a 8,47 - 9,70 e 10,92 μ . La loro evidenza è tale che esse acquistano significato costitutivo oltre che morfologico. La relativa trasparenza all'infrarosso non ha consentito indagini più accurate sulle differenze costitutive tra i prodotti.

E) *Analisi allo spettro ultravioletto*

Proseguendo nelle indagini spettrofotometriche, abbiamo indagato sulla sensibilità alla ionizzazione degli aminoacidi aromatici costituenti i prodotti, ionizzazione alla quale in particolare soggiace la tirosina secondo i concetti esposti da G.H. Beaven e da E.R. Holiday⁽⁵⁾. Secondo gli Autori l'entità dell'assorbimento nell'ultravioletto attorno a 270-290 μ sarebbe dovuta alla presenza di idrossili fenolici derivanti dalla tirosina ed anche in secondo grado dal triptofano. In particolare lo slittamento del massimo di assorbimento verso lunghezze d'onda più alte, sarebbe caratteristico dallo stato di ionizzazione

DIAGRAMMA 5

Spettri infrarosso della sola pectina, del prodotto A (caseina) e del prodotto B (caseina + pectina).

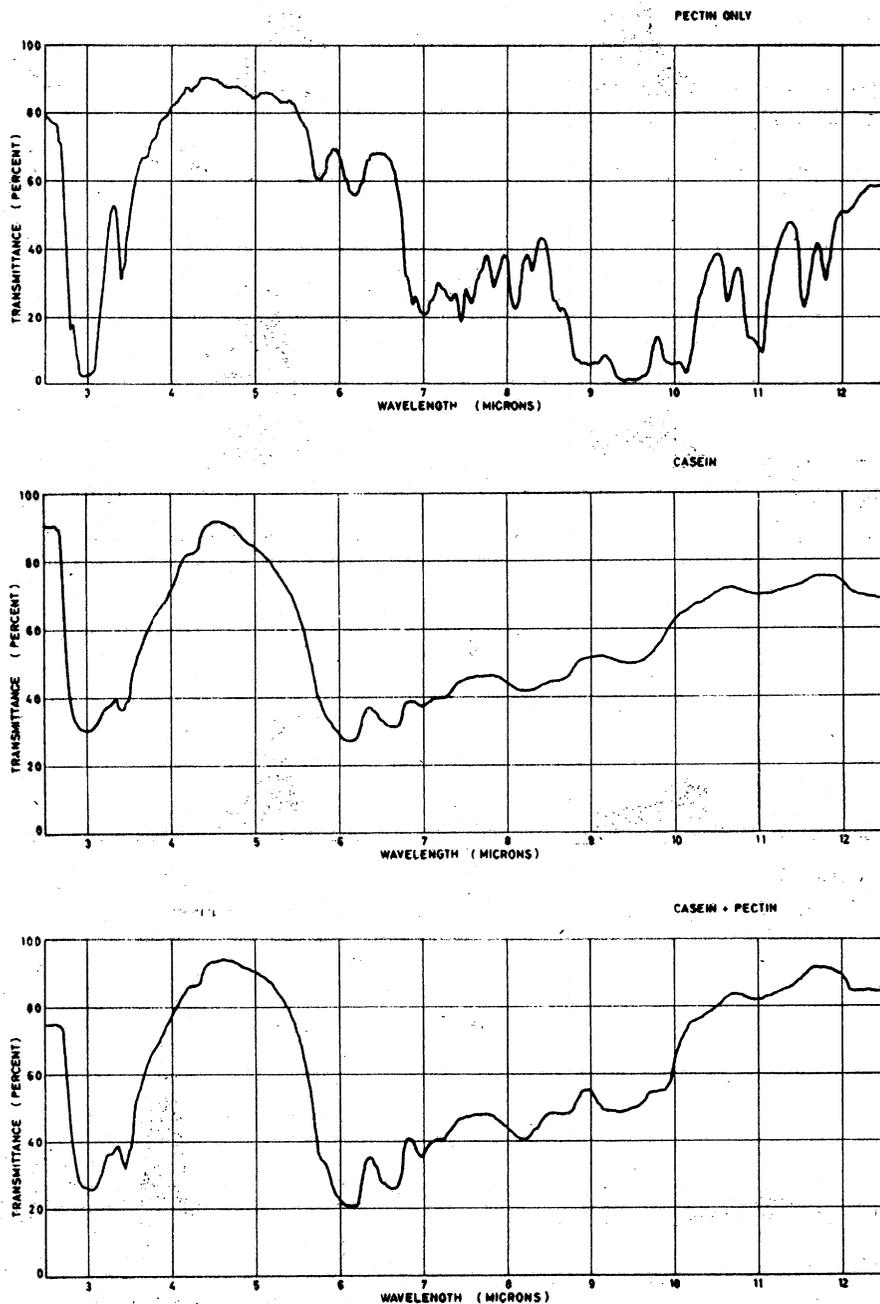
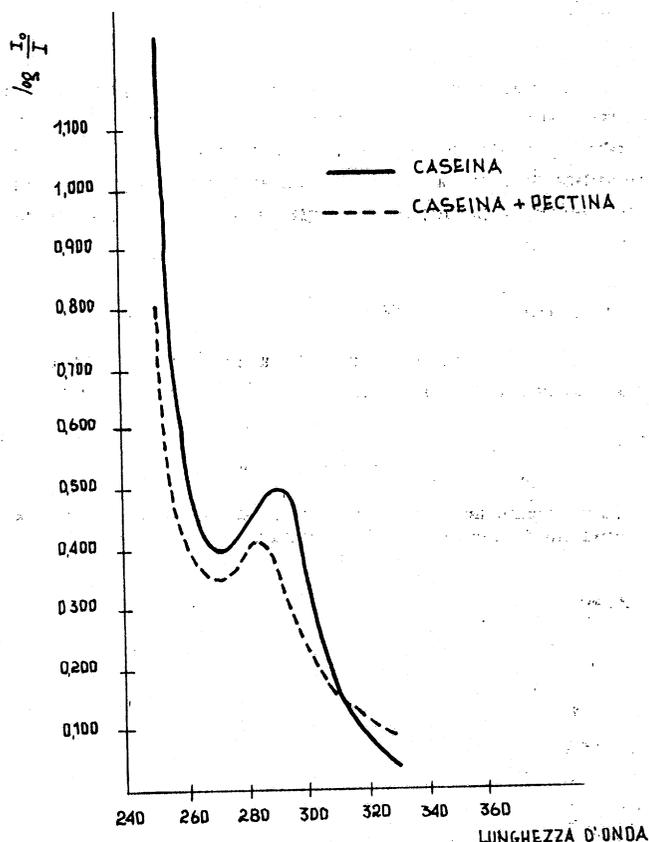


DIAGRAMMA 6

Assorbimento nell'ultravioletto del prodotto A (caseina) e del prodotto B (caseina + pectina), entrambi in soluzione tampone di TRIS a pH 11,4.



della tirosina, in correlazione con la concentrazione idrogenionica.

Abbiamo condotto prove in soluzioni alcaline di prodotto A e prodotto B, tamponate con triossimetilamino-metano (TRIS).

In successive prove sempre più alcaline, riscontrammo un uguale comportamento dei due prodotti. Però, raggiunto pH 11,4, constatammo per il prodotto A, caseina sola, lo slittamento del massimo a mμ 294 (diagramma 6), fenomeno che non si è verificato per il prodotto B, caseina + pectina. A pH, immediatamente più elevato, il suddetto slittamento è comune ad entrambi i prodotti.

Risulterebbe quindi una minor sensibilità alla ionizzazione dei gruppi fenolici della tirosina presenti nel prodotto B. Anche questo può significare che la pectina ha determinato un diverso orientamento spaziale della caseina trovandosi con la stessa in qualche modo legata.

F) Prove di ossidazione

Abbiamo utilizzato il blando potere ossidante della N-bromosuccinimide (NBS) che, come è noto⁽⁶⁾, dà luogo alla rottura del legame peptidico adiacente alla tirosina con formazione di un dienon-lattone, caratterizzato da un massimo di assorbimento nell'ultravioletto a 260 mμ. Nostro scopo era quello di constatare se lo stato di modificazione della caseina, dopo addizione di pectina,

era rilevabile da un confronto sull'ossidabilità dei due prodotti.

Di molte prove eseguite a diversi pH, solo quelle a pH 1,9 hanno dato luogo ad una palese formazione del lattone (diagramma 7). Esse vennero condotte in soluzioni tamponate con K Cl/HCl e bromurate con NBS in soluzione di CH₃ CN all'1%.

Le quantità di ossidante vennero variate facendo riferimento alla quantità necessaria per la teorica ossidazione della quantità di tirosina presente nella caseina.

I risultati migliori vennero ottenuti utilizzando NBS in quantità due volte superiori al teorico. Come appare chiaramente nel diagramma 7, la formazione del lattone in entrambe le soluzioni dei prodotti, è chiaramente percepibile dopo 80' di reazione a 21° C.

A parità di concentrazione della proteina nelle soluzioni (calcolata in base al contenuto di azoto) si riscontra la formazione di maggiori quantità di lattone nel prodotto B (caseina + pectina). Questo comportamento dimostra una maggior ossidabilità del prodotto B e quindi una maggior accessibilità e labilità del legame peptidico adiacente alla tirosina.

G) Idrolisi enzimatica

Entrambi i prodotti sono stati sottoposti all'azione idrolitica di alcune proteasi. Dette prove sono state compiute come mezzo indiretto per riconoscere una eventuale

DIAGRAMMA 7

Assorbimento nell'ultravioletto del prodotto A (caseina) e del prodotto B (caseina + pectina), dopo ossidazione con NBS in soluzione tampone a pH 1,9. A confronto gli assorbimenti del prodotto B e della pectina sola senza addizione di ossidante.

